

**Hydrolysed wheat proteins for condensation polymers prepn. - are hydrolysed in three step process using proteinase(s) with optimum pH in acid and alkaline regions and then peptidase(s) in neutral to weak acidic conditions**

## Patent Number : DE19502168

*International patents classification : A61K-035/78 A23J-003/34 C12P-021/06 A23J-001/12 A61K-007/48 C07K-001/00*

• **Abstract :**

DE19502168 C A method for the prepn. of hydrolysed wheat proteins comprises the following three-step hydrolysis process: treatment of the wheat-contg. starting material with (A) proteinases at pH 2-5; (B) proteinases at pH 8-10; and (C) peptidases at pH 6-7.  
 USE - The hydrolysed proteins are useful for the prepn. of light-coloured N-acylated, N-alkylated or esterified derivs. with good stability during storage (claimed). The proteins are partic. suitable for the prepn. of condensation polymers with 6-22 (12-18) C fatty acids or fatty acid chlorides, esp. lauric acid or coconut fatty acid.  
 ADVANTAGE - The stability during storage of condensation polymers of the hydrolysed proteins is improved, partic. with regard to the problem of fatty acid condensation polymers creating cloudiness in aq. solns.. (Dwg.0/0)

• Publication data :

Patent Family : DE19502168 C1 19960627 DW1996-30 C12P-021/06 4p \* AP: 1995DE-1002168 19950125  
 JP11501207 W 19990202 DW1999-15 A23J-003/34 12p FD:  
 Based on WO9622699 AP: 1996JP-0522588 19960116; 1996WO-EP00147 19960116  
 EP-805631 B1 19990506 DW1999-22 A23J-003/34 Ger FD:  
 Based on WO9622699 AP: 1996EP-0901272 19960116; 1996WO-EP00147 19960116 DSR: DE FR  
 DE59601822 G 19990610 DW1999-29 A23J-003/34 FD: Based on EP-805631; Based on WO9622699 AP: 1996DE-5001822 19960116; 1996EP-0901272 19960116; 1996WO-EP00147 19960116  
 WO9622699 A1 19960801 DW1996-36 A23J-003/34 Ger 19p AP: 1996WO-EP00147 19960116 DSNW: JP US DSRW: AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE

**US5945299** A 19990831 DW1999-42 C12P-021/06 FD:  
 Based on WO9622699 AP: 1996WO-EP00147 19960116; 1997US-0875677 19971006

EP-805631 A1 19971112 DW1997-50 A23J-003/34 Ger FD:  
 Based on WO9622699 AP: 1996EP-0901272 19960116; 1996WO-EP00147 19960116 DSR: DE FR

Priority n° : 1995DE-1002168 19950125  
Covered countries : 18  
Publications count : 7  
Cited patents : DE4116744; DE4410000; EP-298419; EP-495391; EP-578572; FR2688229; JP01300854; JP63216438; US4138500  
2.Jnl.Ref

• Accession codes :

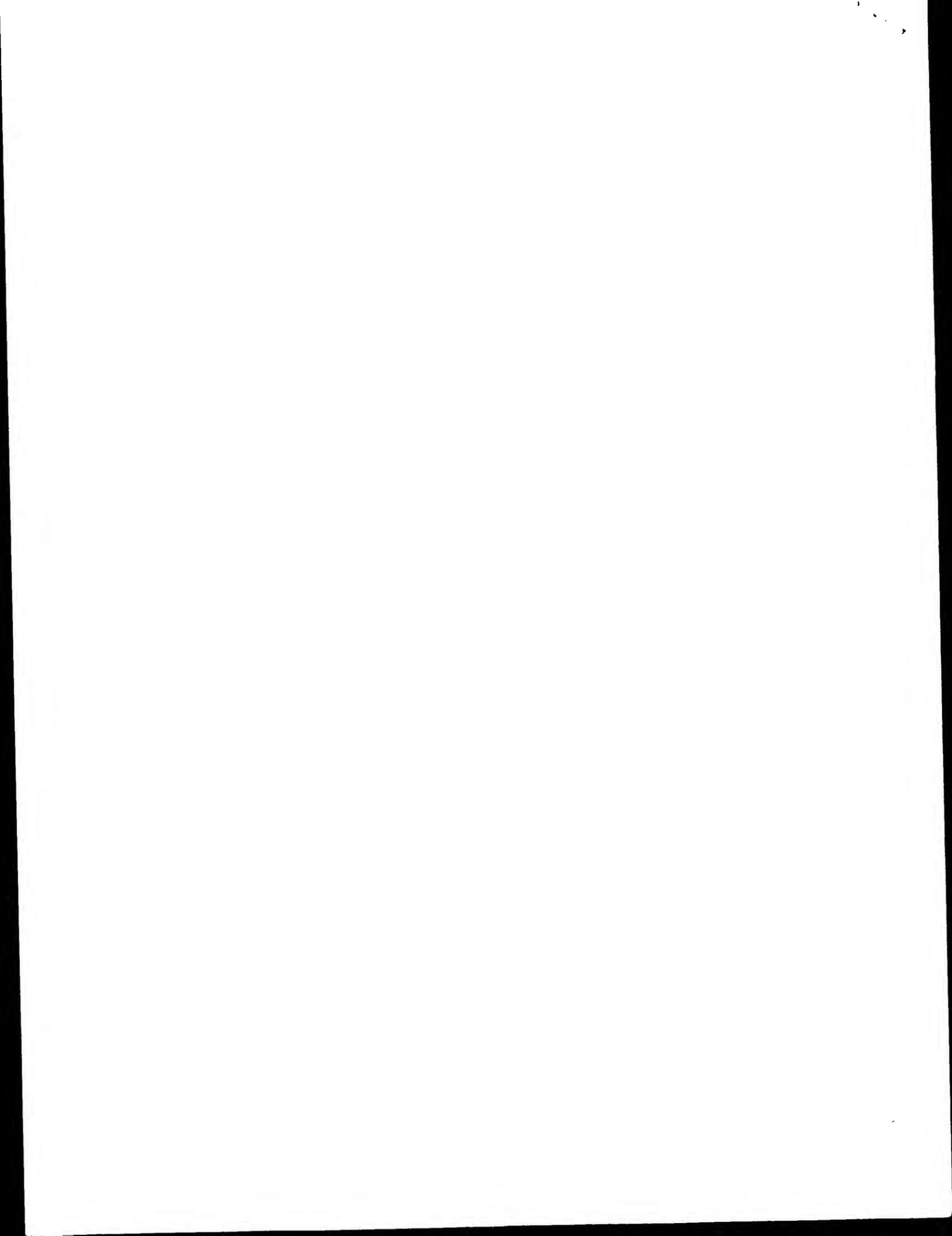
Accession N° : 1996-287922 [30]  
Sec. Acc. n° CPI : C1996-092130

• Derwent codes :

Manual code : CPI: A03-C01 A10-E09  
 D05-A02C  
Derwent Classes : A41 D16

• Update codes :

Basic update code : 1996-30  
Equiv. update code : 1996-36; 1997-50; 1999-15; 1999-22; 1999-29; 1999-42



⑯ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑯ Patentschrift  
⑯ DE 195 02 168 C 1

⑯ Int. Cl. 6:  
C 12 P 21/06  
C 07 K 1/00

⑯ Aktenzeichen: 195 02 168.1-41  
⑯ Anmeldetag: 25. 1. 95  
⑯ Offenlegungstag: —  
⑯ Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 27. 6. 96

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑯ Patentinhaber:

Henkel KGaA, 40589 Düsseldorf, DE

⑯ Erfinder:

Kries, Edith von, Dr., 89257 Illertissen, DE;  
Heilemann, Andrea, Dr., 89079 Ulm, DE; Sander,  
Andreas, Dr., 89257 Illertissen, DE

⑯ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit  
in Betracht gezogene Druckschriften:

DE 41 16 744 A1

⑯ Verfahren zur Herstellung von Weizenproteinhydrolysaten

⑯ Es wird ein verbessertes Verfahren zur Herstellung von Weizenproteinhydrolysaten vorgeschlagen, bei dem man weizenproteinhaltige Ausgangsstoffe zunächst mit Proteinasen und anschließend mit Peptidasen hydrolysiert. Die resultierenden Hydrolysate eignen sich insbesondere zur Herstellung von hellfarbigen, lagerstabilen Kondensationsprodukten mit Fettsäuren.

DE 195 02 168 C 1

## Gebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Weizenproteinhydrolysaten, bei dem man die mehrstufige Hydrolyse in Gegenwart ausgewählter Enzyme durchführt, sowie die Verwendung der Hydrolysate zur Herstellung hellfarbiger, lagerstabiler Derivate.

## Stand der Technik

Abbauprodukte von Polypeptiden, sogenannte Proteinhydrolysate, sind seit langem bekannt. Obschon sie wegen des Fehlens einer lipophilen Gruppe keine Detergenseigenschaften besitzen, werden sie wegen ihrer dispergierenden Eigenschaften und ihrer Fähigkeit, die dermatologische Verträglichkeit anionischer Tenside durch Wechselwirkung mit den Eiweißmolekülen der Haut günstig zu beeinflussen, in einer Vielzahl von oberflächenaktiven Mitteln eingesetzt. Übersichtsartikel hierzu finden sich beispielsweise von A. Domsch et al. in Ärztl. Kosmetol. 13, 524 (1983), G. Schuster et al. in Cosmet. Teil, 99, 12 (1984) und H. Lindner in Parfüm. Kosmet., 66, 85 (1985).

Üblicherweise werden Proteinhydrolysate auf Basis von tierischem Kollagen gewonnen. In den letzten Jahren hat sich jedoch ein Trend nach pflanzlichen Produkten, beispielsweise auf Basis von Weizengluten oder Sojaprotein durchgesetzt.

Aus der französischen Offenlegungsschrift FR 2542013 (ABC) ist beispielsweise die Hydrolyse pflanzlicher Proteine mittels besonderer Milchsäurebakterien in Gegenwart von Kohlenwasserstoffen bekannt. In der US 4757007 (Nisshin) wird die partielle Hydrolyse von Sojaproteinen mit Proteasen in Fraktionen unterschiedlicher Löslichkeit in Trichloressigsäure, Trennung der Fraktionen bei einem pH-Wert von 7, Abtrennung nichthydrolysiert Anteile und Reinigung der Produkte durch Ultrafiltration beschrieben. Gegenstand der europäischen Patentanmeldung EP-A 0 187 048 (Novo) ist der enzymatische Abbau von Sojaproteinen durch Behandlung mit speziellen Proteasen.

Aus der EP-A 0 298 419 (Katayama) ist die Herstellung von Proteinhydrolysaten mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 500 bis 90 000 durch schrittweisen alkalischen, sauren und/oder enzymatischen Abbau von Weizen- oder Sojaproteinen bekannt. In der EP-A 0 363 771 (Nestlé) wird schließlich über ein Verfahren zur Herstellung von Proteinhydrolysaten berichtet, bei dem man pflanzliche Proteine mit Salzsäure hydrolysiert, nichthydrolysierte Bestandteile abtrennt, zur Zerstörung unerwünschter chlorierter Verbindungen alkalisch stellt und die resultierenden Produkte anschließend ansäuert.

Den Verfahren des Standes der Technik ist jedoch gemein, daß sie angewendet auf den pflanzlichen Rohstoff Weizen Produkte liefern, die nach chemischer Derivatisierung, beispielsweise nach Kondensation mit Fettsäurechloriden, verfärbten und nicht ausreichend lagerstabil sind. Ein besonderes Problem besteht beispielsweise darin, daß Fettsäurekondensate von Weizenproteinhydrolysaten des Standes der Technik in wässriger Lösung eine unerwünschte Tendenz zur Ausfällung zeigen.

Die Aufgabe der Erfindung hat somit darin bestanden, für das Problem der unzureichenden Lagerstabilität von Derivaten auf Basis von Weizenproteinhydrolysaten eine Abhilfe zu schaffen.

## Beschreibung der Erfindung

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Weizenproteinhydrolysaten, bei dem man weizenproteinhaltige Ausgangsstoffe

- zunächst bei einem pH-Wert im Bereich von 2 bis 5 mit Proteinasen und
- anschließend bei einem pH-Wert von 8 bis 10 mit Proteinasen behandelt, sowie
- abschließend bei einem pH-Wert von 6 bis 7 mit Peptidasen hydrolysiert.

Nach umfangreichen Untersuchungen der Anmelderin hat sich gezeigt, daß die unzureichende Lagerstabilität der Derivate auf eine unvorteilhafte Molegewichtsverteilung der Vorstufe — also der Weizenproteinhydrolysate — zurückzuführen ist. Demzufolge mußte die Lösung der gestellten Aufgabe auf der Stufe der Weizenproteinhydrolysate greifen. Überraschenderweise wurde gefunden, daß ein enzymatischer Abbau unter besonderer Auswahl der eingesetzten Enzyme zu Hydrolysaten führt, die ihrerseits lagerstabile Derivate, insbesondere in wässriger Lösung trübungsfreie Weizenproteinfettsäurekondensate ergeben.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden als weizenproteinhaltige Ausgangsstoffe Weizengluten sowie entsprechende chemisch bzw. enzymatisch modifizierte Derivate hydrolysiert.

Unter weizenproteinhaltigen Ausgangsstoffen sind Proteinisolate zu verstehen, die beispielsweise durch Extraktion von Weizengrundmehl nach bekannten Verfahren des Standes der Technik erhalten werden und einen Proteingehalt im Bereich von 70 bis 90 Gew.-% aufweisen können.

## Proteinasen und Peptidasen

Proteinasen und Peptidasen zählen zur Gruppe der Proteasen, also Enzymen, welche die hydrolytische Spaltung der Peptidbindung katalysieren und daher systematisch gesehen zu den Hydrolasen gehören. Proteinasen, die auch als Endoproteasen oder Endopeptidasen bezeichnet werden, spalten Peptidbindungen im Inneren des Proteins. Sie sind von den (Exo-)Peptidasen zu unterscheiden, die einen Abbau der terminalen Peptidbindung von der endständigen Amino- bzw. Carboxylgruppe bewirken.

Typische Beispiele für im Sinne des erfindungsgemäßen Verfahrens geeignete Proteininasen sind die im Handel erhältlichen Serin-Proteininasen (EC 3.4.21), Cystein- bzw. Thiol-Proteininasen (EC 3.4.22), saure Proteininasen vom Typ der Aspartat- bzw. Carboxyproteininasen (EC 3.4.23) sowie untergeordnet auch Metall-Proteininasen (3.4.24). Beispiele für geeignete Serin-Proteininasen sind Chymotrypsin, Elastase, Kallikrein, Plasmin, Trypsin, Thrombin und Subtilisin.

Zu den geeigneten Peptidasen zählen beispielsweise die  $\alpha$ -Aminoacylpeptid-Hydrolasen oder Aminopeptidasen (EC 3.4.11), die am Ende des Polypeptids einzelne Aminosäuren ablösen, die Dipeptid-Hydrolasen bzw. Dipeptidasen (EC 3.4.13), die Dipeptide zu Aminosäuren hydrolysiern, die Dipeptidylpeptid-Hydrolasen bzw. Dipeptidylpeptidasen (EC 3.4.14), die Amino-ständige Dipeptide eines Polypeptids freisetzen, Peptidyl-dipeptid-Hydrolasen bzw. Dipeptidylcarboxypeptidasen (EC

3.4.15), die einzelne Aminosäuren des Carboxy-Terminus abtrennen, Carboxypeptidasen (EC 3.4.16—3.4.18) und Omega-Peptidasen (EC 3.4.19), die modifizierte Aminosäuren von beiden Ende des Polypeptids abspalten.

Die Menge der eingesetzten Proteininasen bzw. Peptidasen ist an sich nicht kritisch, sollte jedoch jeweils im Bereich von 0,1 bis 5, vorzugsweise 0,5 bis 2 Gew.-% — bezogen auf die Ausgangsstoffe — liegen.

#### Adsorbentien

Zur Entfernung von Spuren an unerwünschten Farbverursachern hat es sich als vorteilhaft erwiesen, die weizenproteinhaltigen Ausgangsstoffe zusammen mit geeigneten Adsorbentien in die Hydrolyse einzusetzen. Als Adsorbentien kommen beispielsweise Kieselgele, Aluminiumoxide und vorzugsweise Aktivkohlen in Betracht, die in Mengen von 0,1 bis 15, vorzugsweise 1 bis 5 Gew.-% — bezogen auf den Stickstoffgehalt der weizenproteinhaltigen Ausgangsstoffe — eingesetzt werden können.

#### Durchführung des Hydrolyseverfahren

Zur Durchführung der enzymatischen Hydrolyse wird eine wässrige Suspension des weizenproteinhaltigen Ausgangsstoffs gegebenenfalls zusammen mit den Adsorbentien wie oben beschrieben über einen Zeitraum von 1 bis 24 h im Temperatur- und pH-Wertoptimum der eingesetzten Proteininasen und Peptidasen, beispielsweise bei 40 bis 70°C, abgebaut. Besonders vorteilhaft ist es, die Hydrolyse unterhalb der Verkleisterungstemperatur der im Protein noch enthaltenen Kohlenhydrate durchzuführen.

Wird der Aufschluß in Gegenwart von Calciumoxid bzw. Calciumhydroxid als Base durchgeführt, bilden sich lösliche Calciumpeptide, die vom ungelösten Calciumoxid oder Calciumhydroxid durch Filtration abgetrennt werden müssen. Werden die Alkalipeptide gewünscht, empfiehlt es sich, die Calciumpeptide mit Soda- oder Pottaschelösung zu behandeln und das schwerlösliche Calciumcarbonat anschließend abzutrennen. Es ist ebenfalls möglich, das Calcium in Form von Calciumsulfat oder Calciumoxalat zu fällen. Die Abtrennung der schwerlöslichen Salze erfolgt vorzugsweise in Gegenwart von Filterhilfsmitteln mit den üblichen Trennverfahren für Fest/Flüssig-Trennungen wie Filtration und Separation.

Es werden wässrige Weizenproteinhydrolysatlösungen erhalten, die nach Bedarf beispielsweise unter Einsatz von Fallstromverdampfern aufkonzentriert werden können. Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlichen Hydrolysate weisen ein mittleres Molekulargewicht im Bereich von 100 bis 30 000, vorzugsweise 100 bis 10 000 und insbesondere 2000 bis 5000 auf sowie einen Feststoffgehalt von etwa 5 bis 50 Gew.-%.

#### Gewerbliche Anwendbarkeit

Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlichen pflanzlichen Weizenproteinhydrolysate zeichnen sich durch eine besonders vorteilhafte Farbqualität aus und liefern nach Derivatisierung Stoffe, die in wässriger Lösung eine besonders hohe Lagerstabilität zeigen. Insbesondere Fettsäurekondensate auf Basis der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlichen Weizenproteinhydrolysaten lassen sich zu klaren, lagerstabilen

wässrigen Lösungen verarbeiten.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft daher die Verwendung der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlichen Weizenproteinhydrolysate zur Herstellung von hellfarbigen, lagerstabilen Folgeprodukten wie N-acylierten, N-alkylierten, veresterten sowie N-acylierten oder N-alkylierten und zudem veresterten Derivaten.

Vorzugsweise werden die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlichen Weizenproteinhydrolysate in an sich bekannter Weise mit Fettsäuren bzw. Fettsäurechloriden mit 6 bis 22, insbesondere 12 bis 18 Kohlenstoffatomen kondensiert. Besonders bevorzugt ist die Verwendung der Weizenproteinhydrolysate zur Herstellung von Laurinsäure- bzw. Kokosfettsäurekondensaten.

Die folgenden Beispiele sollen den Gegenstand der Erfindung näher erläutern.

20

#### Beispiele

##### Beispiel 1

In einem 5-m<sup>3</sup>-Rührkessel wurden 3500 l Warmwasser ( $T_{max} = 50^\circ\text{C}$ ) vorgelegt und mit 1,3 kg Natriumsulfat und 14 kg Aktivkohle versetzt. Bei 48 bis 50°C wurden bei maximaler Rührerdrehzahl 650 kg Weizenproteinisolat zugesetzt und zu einer Suspension verrührt. Danach wurde der pH-Wert der Reaktionsmischung durch Zugabe von Salzsäure auf pH = 3,0 eingestellt.

Anschließend wurden 5 kg Proteinase mit einem pH-Optimum im sauren Bereich zugegeben. Bei der Hydrolyse und der sich anschließenden ersten Filtration wurde die Temperatur auf maximal 50°C begrenzt und die 35 Sulfitkonzentration oberhalb vom 10 ppm gehalten. Durch Zugabe von Salzsäure wurde der pH-Wert zunächst bei 3,0 gehalten und nach 2 h durch Zugabe von Calciumhydroxid auf 8,5 eingestellt. Gleichzeitig erfolgte die Zugabe von weiteren 14 kg Aktivkohle und 5 kg Proteinase mit einem pH-Optimum im alkalischen Bereich. Ohne pH-Wert-Korrektur wurden weitere 2 h bei etwa 50°C gerührt. Nach Abschluß der enzymatischen Hydrolyseschritte wurde der pH-Wert der Mischung durch Zugabe von Calciumhydroxid auf pH = 7,5 eingestellt. Das so hergestellte Hydrolysat wurde nach Zugabe von 70 kg Filterhilfsmittel (Perlite® P 50) über eine Filterpresse filtriert.

Anschließend wurden zum Filtrat 20 kg Carbopol® GnA gegeben und auf 80°C erhitzt. Diese Temperatur wurde 15 min gehalten. Danach wurde der Ansatz auf 50°C abgekühlt und 30 bei dieser Temperatur gerührt. Nach Zugabe von weiteren 15 kg Filterhilfsmittel wurde noch einmal über eine Filterpresse filtriert. Schließlich wurde das Calcium durch Zugabe von Soda ausgefällt und das Calciumcarbonat über eine Filterpresse abgetrennt. Das Filtrat wurde in einem Fallstromverdampfer bis zu einem Gehalt von 44% Brix aufkonzentriert. Schließlich wurde das Konzentrat mit Natronlauge auf einen pH-Wert von 10 eingestellt und nach einer Lagerung von 5 Tagen unter Zugabe von 15 kg Filterhilfsmittel über eine Filterpresse filtriert.

65

##### Beispiel 2

10 kg des gemäß Beispiel 1 hergestellten Weizenproteinhydrolysates wurden in bekannter Weise mit Laurinsäurechlorid acyliert. Das Reaktionsprodukt wurde auf einen Gehalt von 20 Gew.-% Trockensubstanz ein-

gestellt und 3 Wochen bei 20°C und 40°C gelagert.  
Nach Ablauf der Lagerzeit war das Produkt unter bei-  
den Temperaturbedingungen klar und hatte sich in der  
Farbe nicht verändert.

### Vergleichsbeispiel 1

Ein Weizenproteinhydrolysat des Handels wurde wie  
in Beispiel 2 beschrieben mit Laurinsäurechlorid acy-  
liert. Eine 20 Gew.-%ige Lösung des resultierenden 10  
Weizenproteinfettsäurekondensats trübe bereits nach  
einer Lagerzeit von 1 Woche aus.

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Weizenproteinhydrolysaten, dadurch gekennzeichnet, daß man weizenproteinhaltige Ausgangsstoffe
  - (a) zunächst bei einem pH-Wert im Bereich von 2 bis 5 mit Proteinasen und 20
  - (b) anschließend bei einem pH-Wert im Bereich von 8 bis 10 mit Proteinasen behandelt, sowie
  - (c) abschließend bei einem pH-Wert im Bereich von 6 bis 7 mit Peptidasen hydrolysiert. 25
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man die dreistufige enzymatische Hydrolyse in Gegenwart von Aktivkohle durchführt.
3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß man die Hydrolyse unterhalb 30 der Verkleisterungstemperatur der im Protein noch enthaltenen Kohlenhydrate durchführt.
4. Verwendung der Weizenproteinhydrolysate erhältlich nach dem Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3 zur Herstellung von hellfarbigen, lagerstabilen N-acylierten, N-alkylierten, veresterten sowie N-acylierten oder N-alkylierten und zudem veresterten Derivaten. 35